

THESIS

MUNICH

1967

**Die Beeinflussung des aktiven Ionentransportes
durch herzwirksame Glykoside und ihre Beziehung
zur positiv inotropen Wirkung**

Suse Weber

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Manfred Kiese

**Die Beeinflussung des aktiven Ionentransportes
durch herzwirksame Glykoside und ihre Beziehung
zur positiv inotropen Wirkung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin verfaßt
und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Suse Weber
aus Schwäbisch Gmünd

1967

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof. Dr. Melchior Reiter

Korreferent: Prof. Dr. Manfred Kiese

Dekan: Prof. Dr. Fritz Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 12. 1967

Die vorliegende Arbeit wurde im Pharmakologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Melchior Reiter in der Zeit von April 1964 bis Mai 1966 ausgeführt.

Herrn Professor Reiter danke ich von Herzen für die Überlassung des Themas, für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit und für seine freundliche Unterstützung bei den vielen Schwierigkeiten.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Einleitung</u>	1
<u>Methoden</u>	5
Teil A: Messung der inotropen Wirkung am Papillarmuskel des Meerschweinchens	5
Teil B: Versuche über die Hemmung des Kalium- und Natriumtransportes am Meerschweinchenerythrozyten	7
<u>Ergebnisse</u>	12
Teil A: Die Wirkung von Dihydro-Ouabain auf die Kontraktionskraft des Meerschweinchenpapillarmuskels in Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration des Suspensionsmediums	12
Teil B: Untersuchungen über die Hemmung der Pumpaktivität von Meerschweinchenerythrozyten durch herzwirksame Glykoside	16
Kapitel I: Der Einfluß der Hydrierung des Lactonringes auf die Ionenpumpenhemmung durch Glykoside	16
Kapitel II: Der Einfluß der Natriumkonzentration des Inkubationsmediums auf die Ionentransporthemmung am Meerschweinchenerythrozyten durch Ouabain	20
<u>Diskussion</u>	22
<u>Zusammenfassung</u>	31
<u>Literatur</u>	32

Einleitung

Aus den Untersuchungen vieler Autoren ist bekannt, daß Glykoside den zellulären Ionentransport im Herzmuskel beeinflussen. So stellten schon CALHOUN und HARRISON 1931 am Hundeherz, sowie HAGEN 1939 am Kaninchenherz fest, daß der Kaliumgehalt unter der Einwirkung von Glykosiden abnimmt. Dieser Befund wurde in der Folgezeit an den Herzen verschiedener Tierarten durch eine Reihe von Autoren bestätigt (HAJDU, Pharmacol.Rev. 1959).

Auch an anderen Geweben wurde eine Hemmung von Kalium- und Natriumbewegungen durch Glykoside gefunden, so am Skelettmuskel (MATCHETT and JOHNSON 1954, EDWARDS and HARRIS 1957, WITT 1957, MILLINS and FRUMENTO 1961), der Nervenmembran (CALDWELL and KEYNES 1959) und der Niere (WHITTAM and WILLIS 1962). Die Versuche von CALDWELL und KEYNES am Riesenaxon sind von besonderer Bedeutung, weil es hierbei möglich war, die Hemmsubstanzen auch intrazellulär zu applizieren. Es ergab sich, daß die Glykoside nur wirksam sind, wenn sie von außen an die Zelle herangebracht werden.

SCHATZMANN gelang es 1954, einen Einfluß der Glykoside auf den Ionentransport durch die Erythrozytenmembran festzustellen. Er verwendete für die Versuche kältegelagertes Blut, das er bei 37° unter Zugabe von Glucose als Energielieferant inkubierte. Hierbei wird das in der Kälte verlorene Kalium gegen einen Konzentrationsgradienten wieder in die Zellen gepumpt und das eingeströmte Natrium abgegeben. Diesen Pumpprozess fand SCHATZMANN durch Glykoside gehemmt.

Für die Frage, ob der Einfluß auf den Ionentransport im Herzmuskel mit der inotropen Wirkung gekoppelt ist, ist zunächst von Bedeutung, ob dieser schon bei therapeutischen, d. h. inotrop wirkenden Dosen beobachtet wird, oder erst bei toxischen. Die in der Literatur mitgeteilten Ergebnisse hierzu sind widersprechend (siehe Diskussion).

Weiterhin wäre es für die Frage, ob eine Verknüpfung der Hemmung von Ionenbewegungen mit der positiv inotropen Wirkung vorliegt, wichtig zu wissen, ob Bedingungen, die die

Beeinträchtigung des aktiven Ionentransportes von Glykosiden beeinflussen, auch eine vergleichbare Änderung der inotropen Wirkung verursachen. So müßten beide Effekte die gleiche Abhängigkeit von der äußeren Ionenzusammensetzung aufweisen.

GLYNN fand 1957 in Versuchen an menschlichen Erythrozyten eine Abnahme der Ionenpumpenhemmung der Glykoside durch Erhöhung der Kaliumkonzentration des Außenmediums. Zur Wirkung am Herzmuskel ist bekannt, daß sich toxische Glykosidwirkungen durch Kaliumgaben verringern lassen. So können z.B. Rhythmus- und Reizbildungsstörungen am menschlichen Herzen, die aus Glykosidüberdosierungen resultieren, durch Kaliumgaben beseitigt werden (SAMPSON et al. 1943, ENSELBERG et al. 1950). BAKER stellte 1947 in Versuchen an Kaninchen eine Erhöhung der Letaldosis von Ouabain durch Kaliumzufuhr fest. In Experimenten an Herzen von Entenembryonen fanden FRIEDMAN und BINE 1947 ebenfalls eine Verminderung der toxischen Glykosidwirkung durch Erhöhung der Kaliumkonzentration der Lösung, in der sich die Herzen kontrahierten. HOLLAND und SEKUL konnten 1961 glykosidbedingte Kontrakturen des Kaninchenvorhofs durch erhöhten Kaliumgehalt des umgebenden Mediums verhindern. Ob allerdings die positiv inotrope Wirkung der Glykoside durch eine Änderung der äußeren Kaliumkonzentration beeinflusst werden kann, wird dagegen von den einzelnen Untersuchern verschieden beantwortet. SALTER und RUNNEL (1951) prüften die Abhängigkeit der Kontraktionskraft von der Kaliumkonzentration mit und ohne Glykosidzusatz am isolierten Froschherz. Das Maximum der Kraftentwicklung lag bei 4,8 mM Kalium. Die inotrope Glykosidwirkung war bei niedrigerem Kaliumgehalt größer. Auch CAVIEZEL und WILBRANDT (1958) erzielten durch Verringerung der Kaliumkonzentration eine Steigerung der inotropen Glykosidwirkung am Froschherz. Diesen Ergebnissen widersprechen die Untersuchungen von NAYLER (1950) am Krötenherz und von GARB und VENTURI am Katzenpapillarmuskel aus dem Jahre 1954. Letztere Autoren stellten fest, daß eine Variation der Kaliumkonzentration zwischen 3,5 und 8,5 mM die inotrope Glykosidwirkung am Katzenpapillar-

muskel nicht beeinflusst. Dieser Befund spricht klar gegen eine Beziehung zwischen inotroper Wirkung und Ionenpumpenhemmung. Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse von CAPRIO und FARAH aus dem Jahre 1967, die bei einer Erhöhung der Kaliumkonzentration über 5,4 mM und bei einer Verringerung unter 2,7 mM eine Abnahme der inotropen Ouabainwirkung am Kaninchenherzmuskelstreifen sahen.

Bei einer Verknüpfung der inotropen Wirkung mit der Ionentransporthemmung wäre außer einer gleichsinnigen Ionenabhängigkeit der beiden Effekte auch zu erwarten, daß die Wirkungsunterschiede der einzelnen Glykoside bezüglich der inotropen Wirkung und der Pumpenhemmung gleich groß sind. Eine Arbeit von FÖRSTER und SZIEGOLEIT (1962) befaßt sich mit dieser Frage. Die Autoren untersuchten die Hemmung des Natriumtransportes in Kälteerythrozyten und die positiv inotrope Wirkung am isolierten, durch Phenylbutazon insuffizient gemachten Meerschweinchenvorhof von 15 verschiedenen Digitaliskörpern. Die Reihenfolge der Wirksamkeit der Substanzen war für beide Effekte gleich. Dieses Ergebnis spricht für eine Parallelität von Ionenpumpenhemmung und inotroper Wirkung. Dem widersprechen jedoch die veröffentlichten Untersuchungen mit hydrierten Glykosiden. Während die inotrope Wirkung nach der Hydrierung des Lactonrings in konstantem Maße abnimmt (VICK et al. 1957), variiert die Wirkungsabnahme der Ionenpumpenhemmung bei den verschiedenen Glykosiden um eine Größenordnung (KAHN 1957). Als ein weiteres Argument gegen das Bestehen einer Parallelität von Ionenpumpenhemmung und Kontraktionskraftsteigerung führen KUSCHINSKY et al. (1964) ihre Versuche mit Monoguanylhya-drazon an, das die Kaliumaufnahme von Kälteerythrozyten hemmt, am isolierten Meerschweinchenvorhof aber ausschließlich negativ inotrop wirkt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die angeführten Befunde, die eine Verknüpfung der beiden Glykosideffekte als nicht gegeben erscheinen lassen, erneut experimentell geprüft. Und zwar wurde die Abhängigkeit der inotropen Glykosidwirkung von der äußeren Kaliumkonzentration am Meer-

schweinchenpapillarmuskel untersucht. Es folgten Versuche am Erythrozyten, um die Ionenpumpenhemmung durch hydrierte Glykoside mit der ihrer Ausgangsverbindungen zu vergleichen. Schließlich wurde der Einfluß der äußeren Natriumkonzentration auf die Ionentransporthemmung an der Erythrozytenmembran geprüft, eine Ergänzung, die notwendig schien, nachdem sich eine Natriumabhängigkeit der inotropen Glykosidwirkung ergeben hatte (REITER 1963).

Methoden

A. Messung der inotropen Wirkung am Papillarmuskel des Meerschweinchens

Die Versuche wurden an Papillarmuskeln aus dem rechten Ventrikel von Meerschweinchen im Gewicht zwischen 300 und 350 g durchgeführt. Der Durchmesser der Muskeln war kleiner als 1 mm, ihre Länge in ungedehntem Zustand 3 - 4 mm. Die Muskeln wurden mit Rechteckimpulsen von 1 msec Dauer gereizt, wobei die Reizfrequenz 1 sec^{-1} betrug. Die Spannung des Reizimpulses wurde knapp oberhalb der Reizschwelle eingestellt und lag meist zwischen 3 und 10 Volt. Die als Suspensionsmedium verwendeten Lösungen (nach Krebs-Henseleit variiert) sind in Tabelle I angegeben. Die Kaliumkonzentration wurde ohne osmotischen Ausgleich variiert.

Tabelle I: Elektrolytgehalt der verwendeten Lösungen

endl. Konz. mmol/Liter	Lösung A	Lösung B	Lösung C	Lösung D
Na^+	139,8	139,8	139,8	139,8
K^+	5,91	2,4	4,8	9,6
Mg^{2+}	1,18	1,18	1,18	1,18
Ca^{2+}	3,2	3,2	3,2	3,2
Cl^-	122,83	119,32	121,72	126,52
H_2PO_4^-	1,18	1,18	1,18	1,18
SO_4^{2-}	1,18	1,18	1,18	1,18
HCO_3^-	24,9	24,9	24,9	24,9

Das Muskelbad mit einem Volumen von 47 ml wurde mit einem Gasgemisch von 95 % O_2 und 5 % CO_2 durchströmt. Die Temperatur wurde durch einen Thermostaten auf 35° konstant gehalten. Die isometrischen Kontraktionen wurden bei einer Grundspannung von 400 mg optisch registriert.

Aus den Kontraktionskurven wurde Anstiegs- und Gesamtkontraktionszeit bei 10 % der Kontraktionshöhe gewonnen. Der Berechnung der mittleren Anstiegssteilheit F/t_1 (Kontraktionskraft/Anstiegszeit) in g/sec wurde der 90 % Wert der Kontraktionskraft zugrunde gelegt.

Es wurde die Einwirkung von Dihydro-Ouabain in zwei Konzentrationen auf die Kontraktionskraft von 21 Papillarmuskeln bei Variation der Kaliumkonzentration des Suspensionsmediums untersucht. Die Muskeln kontrahierten sich zunächst in einer Lösung mit 5,9 mM Kalium, bis die Kontraktionskraft konstant blieb. Dann erfolgte der Ersatz derselben durch die Inkubationslösung B, C oder D, in der die inotrope Wirkung geprüft werden sollte. Es wurde nun zunächst $1 \cdot 10^{-5}$ M DHO zugegeben, das Maximum der Kontraktionskraft abgewartet und dann ohne auszuwaschen nochmals dieselbe Dosis DHO hinzugefügt und wieder die maximale Kontraktionskraft registriert. Unter dreimaligem Auswaschen wurde dann das Suspensionsmedium gewechselt und wiederum die Glykosidwirkung untersucht. Auf diese Weise ließ sich die inotrope DHO-Wirkung bei den Kaliumkonzentrationen 2,4 mM, 4,8 mM und 9,6 mM am gleichen Papillarmuskel ermitteln. Da die Muskeln nach der ersten Glykosidgabe nach dem Auswaschen die Kontraktionskraft des Ausgangsniveaus nicht mehr erreichten und vielleicht auch mit einer Glykosisensibilisierung durch die ersten Zusätze zu rechnen ist, wurde die Reihenfolge der Zugabe der im Kaliumgehalt verschiedenen Inkubationsmedien beliebig variiert.

B. Versuche über die Hemmung des Kalium- und Natriumtransportes am Meerschweinchenerythrozyten

Das Blut für die Versuche wurde durch Entbluten von Meerschweinchen gewonnen und durch Zugabe einiger Tropfen einer Heparinlösung (Fa. Hoffmann La-Roche) ungerinnbar gemacht. Zur Senkung des intrazellulären Kaliumgehaltes und des damit verbundenen Anstiegs des Natriumgehaltes wurde das Blut etwa 65 Stunden bei 4° C aufbewahrt, eine Kältelagerungszeit, nach der bei der Inkubation große Netto-Ionenverschiebungen zu erwarten sind (PONDER 1950).

Nach dieser Zeit wurden die Erythrozyten abzentrifugiert und zweimal in einer isotonen, kaliumarmen Lösung gewaschen. Dann wurde gemäß einem Hämatokriten von 44 mit Waschlösung aufgefüllt und so eine Erythrozytensuspension hergestellt.

Alle verwendeten Lösungen sind nach Krebs-Henseleit variiert und calciumfrei. Sie sind in Tabelle II aufgeführt.

Tabelle II: Elektrolytgehalt der verwendeten Lösungen

endl. Konz. mMol/Liter	Waschlösung	Inkubations- lösung E	Inkubations- lösung F
Na ⁺	139,8	110,03	55,03
K ⁺	1,18	35,68	35,68
Mg ²⁺	1,18	1,18	1,18
Cl ⁻	114,9	119,63	64,63
H ₂ PO ₄ ⁻	1,18	1,18	1,18
SO ₄ ²⁻	1,18	1,18	1,18
HCO ₃ ⁻	24,9	24,9	24,9
Saccharose	-	-	126,0

Bei doppeltem Ansatz sämtlicher Proben wurden nun jeweils 4 ml der Inkubationslösung E oder F und 1 ml der bereiteten Erythrozytensuspension (0,44 ml Erythrozyten + 0,56 ml Waschlösung) in ein 25 ml-Erlenmeyerkölbchen gebracht. Die so erhaltene endliche Kaliumkonzentration betrug 31 mM und entsprach dem Kaliumgehalt des Kälteserums. Zwei dieser Proben dienten als Ausgangswert. Zu den restlichen Ansätzen wurden jeweils 20 mg Glucose hinzugefügt. Zwei derselben dienten als Kontrollen. Den übrigen Proben wurden in verschiedenen Konzentrationen die zu testenden Glykoside zugesetzt.

Es wurden folgende Glykoside verwendet: Ouabain (Merck), entsprechend DAB 6, Dihydro-Ouabain, Digoxin, Dihydro-Digoxin, Digitoxin und Dihydro-Digitoxin (Hommel AG Zürich). Die hydrierten Glykoside enthielten nicht mehr als 0,3 % unhydrierter Ausgangssubstanz.

Die den Proben zuzusetzenden Glykoside waren entweder in 0,2 ml Aqua dest. oder 2,5 ml Inkubationslösung oder 0,5 ml 50 %-igem Alkohol gelöst. Nach Zugabe der in Alkohol gelösten Glykoside betrug die Alkoholkonzentration des Ansatzes 5 %. Auch den Kontrollen einer Meßreihe wurde die gleiche Menge an Lösungsmittel zugefügt.

Nach Zugabe der gelösten Substanz wurden die mit Gummistopfen verschlossenen Kölbchen im Wasserbad bei 37° unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Proben in Spezialzentrifugenröhrchen mit engem Ausläufer 20 Minuten bei 5 000 G zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden mit engen Mikropipetten vom Boden des Gläschens 0,1 ml gepackte Erythrozyten aufgesogen, quantitativ in ein 25 ml-Meßkölbchen gebracht, mit Aqua dest. hämolyisiert und bis zur Marke aufgefüllt.

Die Kalium- und Natriumbestimmung erfolgte nach vollständiger Hämolyse mit einem Beckmann-Flammenphotometer DU für Kalium bei einer Wellenlänge von 768 m μ , für Natrium von 589 m μ . Unter Berücksichtigung der Verdünnung ließ sich daraus der Kalium- und Natriumgehalt der gepackten Erythrozyten ermitteln.

Orientierende Vorversuche dienten der Untersuchung der zeitlichen Abhängigkeit der Pumpaktivität während 9-stündiger Inkubation bei 37° in Inkubationslösung E. Die Ausgangswerte waren $94,5 \pm 2$ mMol Kalium und $37,7 \pm 1$ mMol Natrium pro Liter gepackter Kälteerythrozyten. Nach 3, 6 und 9 Stunden wurden jeweils 2 Kölbchen zur Feststellung des Kalium- und Natriumgehaltes der Erythrozyten aus dem Wasserbad entfernt. Tabelle III gibt die gemessenen Durchschnittswerte der einzelnen Versuche an. In Abb. 1a sind die gemittelten Zunahmen der Kaliumkonzentration und Abnahmen der Natriumkonzentration in ihrer zeitlichen Abhängigkeit aufgetragen. Diese Art der Darstellung nimmt keine Rücksicht auf Schwankungen des Zellvolumens, wie sie während der Inkubation auftreten können. Bei späteren Versuchen zeigte sich bei Hämoglobinmessungen im Zellhämolyse eine Zunahme des Hämoglobingehaltes von 10 % nach der Inkubation im Vergleich mit den Ausgangswerten. Diese könnte sowohl durch eine Zellschrumpfung als auch durch eine größere Packungsdichte der Erythrozyten im Zentrifugat bedingt sein. Nach BARNES et al. (1948) wird der Extrazellulärraum des Erythrozytenbreis mit 5 % veranschlagt. Nimmt man eine Abnahme auf die Hälfte nach der Inkubation an, so wäre nur eine Zunahme des Hämoglobingehaltes von etwa 2,5 % zu erwarten. Als Ursache für die beobachtete Zunahme von 10 % ist deshalb eine Zellvolumenschrumpfung anzunehmen. Dadurch bedingte Versuchsfehler lassen sich durch die Bildung des Quotienten Kalium intrazellulär / Natrium intrazellulär ausschalten.

In Abb. 1b sind die Ergebnisse der Vorversuche als Zunahme dieses Quotienten, der zu Beginn der Inkubation durchschnittlich 2,535 betrug, während der 9-stündigen Versuchsdauer dargestellt. In den ersten 3 Stunden erhöhte sich der Quotient um 1,487, in den nächsten 3 Stunden um 1,417 und in der folgenden Inkubationsperiode um 1,354, wobei sich alle Werte signifikant unterscheiden ($p < 0,01$). Es ergibt sich also eine fast als Gerade verlaufende Kurve mit geringer Abflachung bei steigenden Inkubationszeiten.

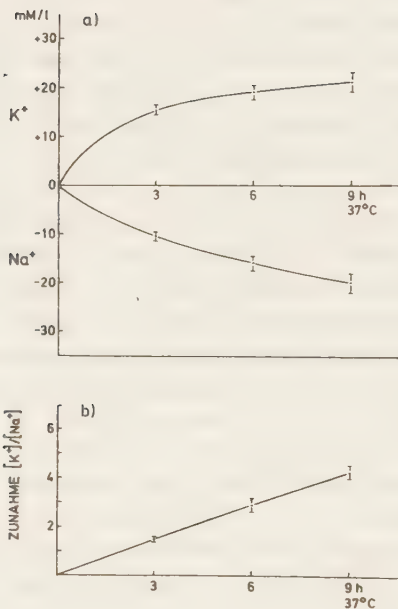


Abb. 1 : Zeitliche Abhängigkeit der Pumpaktivität während 9-stündiger Inkubation (Mittelwerte von 5 - 7 Bestimmungen, siehe Tabelle III).

Abszisse: Zeit in Stunden,

Ordinate: 1a: Zunahme des K^+ - bzw. Abnahme des Na^+ - Gehaltes in mMol / Liter gepackter Erythrozyten ($\pm$ standard error),

1b: Zunahme des Quotienten Kalium intrazellulär / Natrium intrazellulär ($\pm$ standard error).

Tabelle IIIa: Messwerte der intrazellulären Kalium- und Natriumbestimmung von 5 - 7 Vorversuchen in mMol/l

Nr.	Ausgangswert			3 Std. Inkubation			6 Std. Inkubation			9 Std. Inkubation		
	K ⁺	Na ⁺	K ⁺ /Na ⁺	K ⁺	Na ⁺	K ⁺ /Na ⁺	K ⁺	Na ⁺	K ⁺ /Na ⁺	K ⁺	Na ⁺	K ⁺ /Na ⁺
1	101,8	41,3	2,465	115,6	31,3	3,693	121,8	28,1	4,335			
2	98,7	37,5	2,632	116,1	27,3	4,253	120,6	22,5	5,360			
3	93,7	40,7	2,302	111,2	26,2	4,244	116,2	19,3	6,021	117,5	18,1	6,492
4	99,3	31,8	3,123	110,0	24,4	4,508	111,8	17,5	6,389	112,5	16,3	6,902
5	91,9	40,0	2,298	108,7	28,1	3,868	110,6	23,7	4,667	114,3	15,0	7,620
6	89,4	40,5	2,207	105,0	31,4	3,344				111,2	18,7	5,947
7	87,0	32,0	2,719				104,6	17,0	6,153	104,6	17,0	6,950

Nr.	3 Std. Inkubation			6 Std. Inkubation			9 Std. Inkubation		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1	13,8	10,0	1,228	20,0	13,2	1,870			
2	17,4	10,2	1,621	21,9	15,0	2,728			
3	17,5	14,5	1,942	22,5	21,4	3,719	23,8	22,6	4,190
4	10,7	7,4	1,385	12,5	14,3	3,266	13,2	15,5	3,779
5	16,8	11,9	1,570	18,7	16,3	2,369	22,4	25,0	5,322
6	15,6	9,1	1,137				21,8	21,8	3,740
7				17,6	15,0	3,434	24,2	16,0	4,231

Tabelle IIb:
a = Kaliumzunahme in mMol/l
b = Natriumzunahme in mMol/l
c = Zunahme K⁺/Na⁺

Ergebnisse

A. Die Wirkung von Dihydro-Ouabain auf die Kontraktionskraft des Meerschweinchenpapillarmuskels in Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration des Suspensionsmediums

Es wurde die inotrope Glykosidwirkung an 21 Papillarmuskeln bei wechselnder Kaliumkonzentration im Inkubationsmedium untersucht. In Abb. 2a sind die Mittelwerte der Ausgangskontraktionskraft und die nach DHO-Zugabe erzielten in Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration aufgetragen. Eine Steigerung des Kaliumgehaltes von 4,8 mMol auf 9,6 mMol bewirkt demnach keine Änderung der Kraftentwicklung. Dies entspricht den Befunden von GREEN et al. aus dem Jahre 1951 am Katzenpapillarmuskel. Dagegen ergibt sich bei einer Senkung auf 2,4 mMol eine signifikante Zunahme um 100 mg am Meerschweinchenpapillarmuskel, während GREEN et al. eine konstante Kontraktionskraft im Bereich von 2,15 - 10,15 mMol Kalium erhielten. Zweimalige Zugabe von 10^{-5} M Dihydro-Ouabain hat bei allen getesteten Kaliumkonzentrationen eine positiv inotrope Wirkung zur Folge. Diese ist bei niedrigerem Kaliumgehalt des umgebenden Mediums signifikant größer als bei höherem und damit umgekehrt proportional der Kaliumkonzentration (Abb. 2a und 2b). Diese Ergebnisse entsprechen der von GLYNN (1957) gefundenen Kaliumabhängigkeit der Ionenpumpenhemmung und lassen eine Verknüpfung dieser beiden Glykosideffekte annehmen.

Eine positiv inotrope Wirkung am Herzmuskel kann sowohl durch eine Verlängerung der Anstiegszeit als auch durch eine Steigerung der Anstiegssteilheit hervorgerufen werden. Die herzwirksamen Glykoside wirken über eine Steigerung der Anstiegssteilheit. Eine Hemmung der positiv inotropen Wirkung könnte man sich nun durch eine Verkürzung der Anstiegszeit oder eine Verminderung der Anstiegssteilheit bedingt vorstellen. Abb. 3 zeigt die Dihydro-Ouabainwirkung auf die Anstiegssteilheit in Abhängigkeit

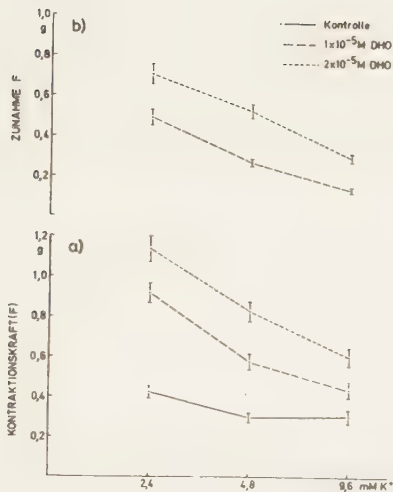


Abb. 2 : Dihydro-Ouabainwirkung auf die Kontraktionskraft des Meerschweinchenpapillarmuskels in Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration des Inkubationsmediums.
 Abszisse: Kaliumkonzentration in mMol/Liter,
 Ordinate: 2a: Kontraktionskraft (F) in g ($\pm$ standard error),
 2b: Zunahme der Kontraktionskraft (F) bei Dihydro-Ouabainzugabe in g ($\pm$ standard error).

von der Kaliumkonzentration. Es ergeben sich dieselben Verhältnisse wie für die Kontraktionskraft, d. h.: Eine Vermehrung des Kaliumgehaltes von 4,8 mM auf 9,6 mM bewirkt keine Änderung der Anstiegssteilheit der Ausgangskontraktionskraft. Eine Senkung auf 2,4 mM hat dagegen eine signifikante Zunahme zur Folge (Abb. 3a). Die Vergrößerung der Anstiegssteilheit unter Dihydro-Ouabaineinwirkung ist wieder abhängig von der Kaliumkonzentration (Abb. 3a und 3b). Die Anstiegs-

zeit der Kontraktionen ist bei den einzelnen Kaliumkonzentrationen nicht signifikant verschieden, und auch nach Glykosidzugabe wird sie nicht entscheidend verändert (Abb. 4). Die Verminderung der inotropen Glykosidwirkung durch Kaliumionen wird also nicht durch eine Verkürzung der Anstiegszeit verursacht sondern durch eine Hemmung der glykosidbedingten Steigerung der Anstiegssteilheit.

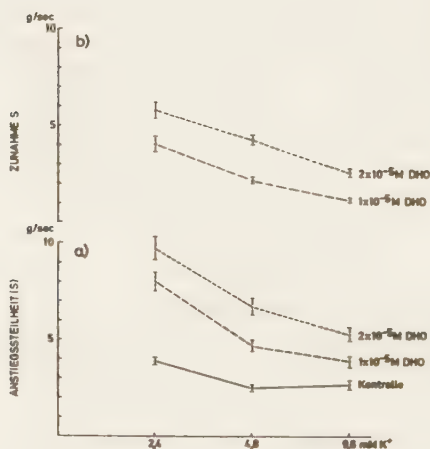


Abb. 3 : Dihydro-Ouabainwirkung auf die Anstiegssteilheit der Kontraktionen des Meerschweinchenpapillarmuskels in Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration des Inkubationsmediums.

Abszisse: Kaliumkonzentration in mMol/Liter,
Ordinate: 3a: Anstiegssteilheit (S) in g/sec
($\pm$ standard error),

3b: Zunahme der Anstiegssteilheit (S) bei Dihydro-Ouabainzugabe ($\pm$ standard error).

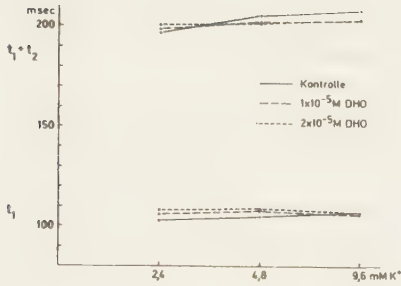


Abb. 4 : Dihydro-Ouabainwirkung auf die Anstiegs- und Gesamtzeit der Kontraktionen des Meerschweinchenpapillarmuskels in Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration des Inkubationsmediums. Abszisse: Kaliumkonzentration in mMol/Liter, Ordinate: t_1 = Anstiegszeit, $t_1 + t_2$ = Gesamtzeit in msec.

B. Untersuchungen über die Hemmung der Pumpaktivität von Meerschweinchenerythrozyten durch herzwirksame Glykoside

I. Der Einfluß der Hydrierung des Lactonringes auf die Ionenpumpenhemmung durch Glykoside

Um die Abschwächung der Glykosidwirkung an der Erythrozytenmembran nach der Hydrierung des Lactonringes von verschiedenen Glykosiden miteinander vergleichen zu können, wurden die Dosis-Wirkungskurven der Hemmung der Kalium/Natriumpumpe am Meerschweinchenerythrozyten von den Glykosiden Digitoxin, Digoxin und Ouabain sowie deren Hydrierungsprodukten ermittelt. Die Struktur der untersuchten Verbindungen ist in Abb. 5 aufgezeichnet.

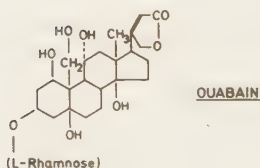
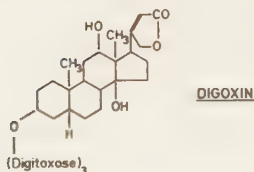
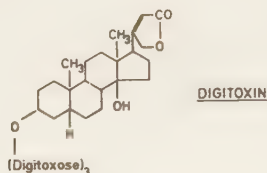


Abb. 5 : Struktur der untersuchten Substanzen. Bei den hydrierten Verbindungen entfällt die Doppelbindung im Lactonring.

Jede Substanz wurde in der Regel in 9 Versuchen während 3-stündiger Inkubation in Inkubationslösung E geprüft. Eine Meßreihe erhielt jeweils ein Glykosid in verschiedenen Konzentrationen.

Aus den gefundenen Meßwerten für Kalium und Natrium wurde der Quotient K^+/Na^+ gebildet (siehe methodischer Teil). Die Zunahme dieses Quotienten nach 3-stündiger Inkubation ohne Glykosidzusatz wurde als 100 % der in der Netto-Verschiebung von K^+ und Na^+ sich zeigenden aktiven Transportleistung betrachtet. Der Vergleich dieses Wertes mit den bei den verschiedenen Glykosidkonzentrationen erhaltenen ergab dann die jeweilige Hemmung des Pumpprozesses.

Abb. 6 zeigt die gefundenen Dosis-Wirkungsbeziehungen für die Abhängigkeit der Transporthemmung von der Glykosidkonzentration. Eine über 100 % hinausgehende Wirkung ist dadurch zu erklären, daß bei Hemmung des aktiven Transportes passive, auf Diffusion beruhende Ionenströme ungehindert weiterfließen und so eine Abnahme des Quotienten

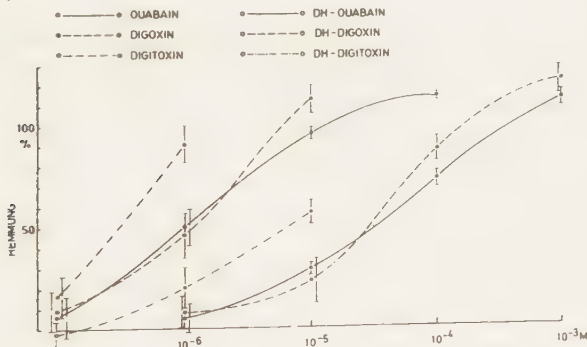


Abb. 6 : Dosis-Wirkungskurven der Hemmung des aktiven Ionen-transportes durch herzwirksame Glykoside. Abszisse: Glykosidkonzentration in log. Maßstab, Ordinate: Prozentuale Hemmung des aktiven Ionen-transportes ($\pm$ standard error).

Kalium intrazellulär / Natrium intrazellulär unter den Ausgangswert bedingen. Auch könnte eine unspezifische Membranschädigung bei hohen Glykosiddosen den passiven Ionenaustausch verstärken.

Die ED_{50} wurde aus den Kurven der Abb. 6 ermittelt und in Tabelle IV aufgeführt. Es ergibt sich,

Tabelle IV: ED_{50} der Wirkung herzwirksamer Glykoside auf den zellulären Ionentransport

Herzwirksames Glykosid	ED_{50}
Digitoxin	$3,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
Dihydro-Digitoxin	$6,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
Digoxin	$1,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
Dihydro-Digoxin	$3,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
Ouabain	$1,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
Dihydro-Ouabain	$3,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

daß die Wirkungsstärke der hydrierten Substanzen geringer ist als die der nicht hydrierten. Für die einzelnen Glykosidpaare ergibt sich folgender Wirkungsunterschied:

$$\frac{ED_{50} \text{ Dihydro-Digitoxin}}{ED_{50} \text{ Digitoxin}} = 22$$

$$\frac{ED_{50} \text{ Dihydro-Digoxin}}{ED_{50} \text{ Digoxin}} = 25$$

$$\frac{ED_{50} \text{ Dihydro-Ouabain}}{ED_{50} \text{ Ouabain}} = 34$$

Er liegt somit bei allen drei Glykosidpaaren in derselben Größenordnung. Um eine 50 %-ige Hemmung zu erzielen, genügen von Digitoxin der 22. Teil der ED_{50} von Dihydro-Digitoxin, von Digoxin der 25. Teil der ED_{50} von Dihydro-Digoxin und

von Ouabain der 34. Teil der ED_{50} von Dihydro-Ouabain. Dieser Wirkungsunterschied entspricht dem der inotropen und toxischen Wirkung (BACH und REITER 1964).

Auch KAHN fand 1957 bei Versuchen am menschlichen Erythrozyten die hydrierten Substanzen schwächer wirksam, allerdings mit weniger konstantem Verhältnis. Er bezieht die Wirkung auf die Hemmung des Kaliumtransportes. Dabei ist Dihydro-Ouabain 1/20 so stark wirkend wie Ouabain, Dihydro-Digitoxin 1/10 so stark wie Digitoxin und Dihydro-Digoxin 1/300 so stark wie Digoxin. Da die inotrope Wirkungsabschwächung nach der Hydrierung aller drei Glykoside in der gleichen Größenordnung liegt, spräche der große Wirkungsunterschied zwischen Dihydro-Digoxin und Digoxin am Erythrozyten, wie KAHN ihn fand (1:300 gegenüber 1:20 bei Dihydro-Ouabain und Ouabain), gegen eine Korrelation von Transporthemmung und inotroper Wirkung. Dieser Befund konnte bei den Versuchen am Meerschweinchenerythrozyten nicht erhoben werden. Hier war die Wirkungsabschwächung der Ionenpumpenhemmung und inotropen Wirkung entsprechend. Damit wird ein wichtiges Argument gegen eine Beziehung dieser beiden Glykosideffekte zueinander entkräftet.

Als Nebenfund ergeben sich Speziesunterschiede in der Wirkungsstärke der einzelnen Glykoside. So reagieren menschliche Erythrozyten am empfindlichsten auf Ouabain (KAHN 1957), die des Meerschweinchens auf Digitoxin (siehe Abb. 6).

II. Der Einfluß der Natriumkonzentration des Inkubationsmediums auf die Ionentransporthemmung am Meerschweinchenerythrozyten durch Ouabain

Ausgehend von dem Befund der Natriumabhängigkeit der positiv inotropen Wirkung von Glykosiden (REITER 1963) wurde untersucht, ob diese auch für die Wirkung an der Erythrozytenmembran gilt. Hierfür wurden die Dosis-Wirkungskurven für die Pumpenhemmung von Ouabain bei Inkubation in Inkubationslösung E und F ermittelt, die sich in ihrer Natriumkonzentration unterscheiden.

Abb. 7 zeigt die erhaltenen Dosis-Wirkungsbeziehungen bei den untersuchten Natriumkonzentrationen. Bei 10^{-6} M ($p < 0,05$), 10^{-5} M ($p < 0,01$) und 10^{-4} M ($p < 0,01$) Ouabain unterscheiden sich die Größen der Transporthemmung

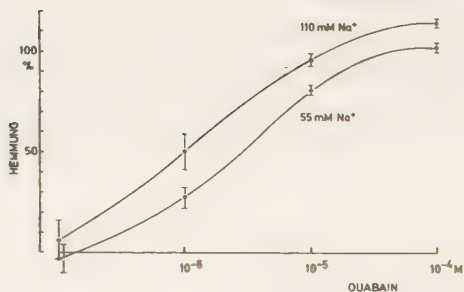


Abb. 7: Hemmung der Kalium/Natriumpumpe des Meerschweinchenerythrozyten durch Ouabain bei Inkubation in 110 mM und 55 mM Natrium.

Abszisse: Ouabainkonzentration in log. Maßstab,
Ordinate: Prozentuale Hemmung des aktiven Ionentransportes ($\pm$ standard error).

signifikant. Als ED_{50} ergibt sich bei 110 mM Natrium $1,0 \cdot 10^{-6}$ M und bei 55 mM Natrium $2,6 \cdot 10^{-6}$ M Ouabain. Das Ausmaß der Wirkungsabschwächung bei Natriumverminderung ist hierbei mit der Hemmung der positiv inotropen Wirkung vergleichbar (REITER 1963). Es konnte also eine sich entsprechende Abhängigkeit der beiden Glykosideffekte sowohl von der Kalium- als auch von der Natriumkonzentration nachgewiesen werden.

Diskussion

Die positiv inotrope Glykosidwirkung am Meerschweinchenpapillarmuskel wird durch Erhöhung der Kaliumkonzentration des Suspensionsmediums gehemmt (Abb. 2). Die Kontraktionskraftzunahme durch Dihydro-Ouabain ist umgekehrt proportional der Kaliumkonzentration im Bereich von 2,4 mM - 9,6 mM.

Dem widersprechen die Untersuchungen von GARB und VENTURI am Katzenpapillarmuskel (1954). Die Autoren fanden die inotrope Glykosidwirkung unabhängig von der äußeren Kaliumkonzentration zwischen 3,5 mM und 8,5 mM. Die Ursache dieses gegenteiligen Befundes liegt vielleicht in ihren Versuchsbedingungen. Die Autoren verwendeten bicarbonatfreie Lösung, in der sich der Herzmuskel nicht optimal kontrahiert (SANYAL und SAUNDERS 1957). Die Untersuchungen von CAPRIO und FARAH am Kaninchenherzmuskelstreifen (1967) ergaben in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit eine Abnahme der inotropen Glykosidwirkung durch Erhöhung der Kaliumkonzentration über 5,4 mM. Durch eine Senkung des Kaliumgehaltes unter 2,7 mM erzielten die Autoren jedoch ebenfalls eine Wirkungsabschwächung. Dies beruht auf dem inotropen Effekt der Kaliumverminderung: In kaliumarmer Lösung kontrahiert sich der Muskel fast mit maximaler Kraft (STICHEL und REITER 1965), so daß eine Kontraktionsverstärkung durch Glykoside nicht mehr möglich ist. Da die Muskeln bei einer Verminderung der Kaliumkonzentration unter 2,4 mM fast regelmäßig zu spontanen Kontraktionen neigten, wurde in der vorliegenden Arbeit die inotrope Glykosidwirkung bei Kaliumkonzentrationen unter diesem Wert nicht untersucht.

Die inotrope Glykosidwirkung wird in ähnlicher Weise vom Kaliumgehalt des umgebenden Mediums beeinflusst wie die Ionenpumpenhemmung (GLYNN 1957). GLYNN erklärt diese antagonistische Kaliumwirkung an der Erythrozytenmembran durch die Annahme, daß sich die Glykoside an einen Receptor der Zelloberfläche binden, der mit dem Carrier für Kaliumionen

identisch sein könnte. Für diese Hypothese spricht der am Riesenaxon erhobene Befund von CALDWELL und KEYNES (1959), daß Glykoside die Ionenpumpe nur hemmen, wenn sie von außen an die Zelle herangebracht werden. Auch die Abschwächung der inotropen Glykosidwirkung könnte man sich in einer solchen Verdrängung des Glykosids vom Receptor der Zellmembran durch Kaliumionen vorstellen.

Beim Vergleich der Wirksamkeit der Glykoside Ouabain, Digoxin und Digitoxin mit der ihrer hydrierten Derivate zeigt sich nach der Hydrierung des Lactonringes eine konstante Abschwächung der Ionenpumpenhemmwirkung auf $1/20 - 1/30$ der Wirkungsstärke der nicht hydrierten Substanz. Diese Abnahme entspricht der der inotropen Wirkung (VICK et al. 1957). Abweichend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit fand KAHN (1957) nach der Hydrierung des Digoxins eine um eine Größenordnung stärkere Wirkungsabschwächung an der Erythrozytenmembran als nach der Hydrierung der übrigen untersuchten Glykoside. Der widersprechende Befund KAHNS beruht möglicherweise auf einer zu weitgehenden Hydrierung und damit Veränderung des verwendeten Digoxins, so daß das getestete Dihydro-Digoxin fast unwirksam war. Da die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit eine konstante Wirkungsabschwächung nach der Hydrierung auch an der Erythrozytenmembran ergaben, entfällt damit ein wesentliches Argument gegen einen Zusammenhang zwischen Pumpenhemmung und inotroper Wirkung.

Eine weitere Beziehung zwischen inotroper Wirkung und Membranwirkung ergibt sich in der Natriumabhängigkeit. Der Abnahme der inotropen Glykosidwirkung am Meerschweinchenpapillarmuskel bei Verringerung der Natriumkonzentration im Suspensionsmedium (REITER 1963) entspricht auch die schwächere Hemmung der Kalium/Natriumpumpe am Erythrozyten. Der natriumabhängige Wirkungsunterschied ist hierbei auch quantitativ vergleichbar.

Die in der Einleitung dargelegten Einwände gegen eine Beziehung zwischen den beiden Glykosidwirkungen, der Beeinflussung der Mechanik und der Pumpenleistung der

Membran, ließen sich also hiermit entkräften. Die aufgezeigten Parallelen zwischen beiden Effekten stehen demnach nicht im Widerspruch mit einer Verknüpfung zwischen der Hemmung von Ionenbewegungen mit dem positiv inotropen Herzeffekt.

Um sich über den möglichen Mechanismus dieser Verknüpfung eine Vorstellung zu verschaffen, muß zunächst geklärt werden, auf welche Weise die Glykoside die Ionenbewegungen durch die Zellmembran beeinflussen. In den Versuchen am Erythrozyten wurden jeweils Netto-Ionenströme gemessen. Da diese gegen ein Konzentrationsgefälle gerichtet sind, ist anzunehmen, daß sie Folge einer aktiven, stoffwechselabhängigen Ionenbewegung sind. Diese Annahme wird durch die fehlende Kaliumzunahme und Natriumabnahme von Kälteerythrozyten bei Wiedererwärmung ohne Glucosezusatz gesichert (PONDER 1950, MAIZELS 1951). MAIZELS erhält in diesem Falle sogar eine beschleunigte, rascher als in der Kälte verlaufende Kaliumabgabe und Natriumaufnahme der Erythrozyten, da sich hier nur passive Ströme bemerkbar machen und diese bei höheren Temperaturen beschleunigt werden. Bei Zugabe von Stoffwechselgiften (MAIZELS 1951) unterbleiben die Ionenbewegungen gegen den Konzentrationsgradienten ebenfalls. In die gemessenen Netto-Ströme gehen jedoch auch passive Bewegungen ein, und zwar jeweils in beiden Richtungen, wobei diejenige mit dem Konzentrationsgradienten größer ist. Diese Einzelströme konnten von GLYNN (1957) mit radioaktiven Ionen gemessen werden. Er fand den Kaliumeinstrom aus 2 Komponenten bestehend, von denen die eine, passive, linear mit der äußeren Kaliumkonzentration variiert, die andere, aktive, durch Glucoseentzug beträchtlich vermindert wird. Auch der Natriumausstrom besteht aus 2 Komponenten, von denen die aktive $\frac{2}{3}$ beträgt und sowohl durch Glucoseentzug als auch durch Kaliumverminderung in der Außenlösung gehemmt wird. Das andere, passive Drittel ist glykolyse- und kaliumunabhängig.

Die Verminderung der Netto-Ionenströme entgegen dem Konzentrationsgradienten, wie sie bei Zugabe von Glykosiden beobachtet wird (SCHATZMANN 1954, KAHN und ACHESON 1955,

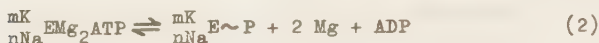
JOYCE und WEATHERALL 1955, SOLOMON et al. 1956, LUNDGAARD-HANSEN 1957), ist sicher durch eine Hemmung des aktiven, 'bergauf' Transportes bedingt, da die passiven Ionenströme durch Glykoside nicht gesteigert (SCHATZMANN 1954, LUNDGAARD-HANSEN 1957) sondern ebenfalls gehemmt (GLYNN 1957) werden.

Die Hemmung des aktiven Transportes kann grundsätzlich auf zwei verschiedenen Wegen erreicht werden, entweder durch eine Blockierung der Stoffwechselvorgänge oder einen Eingriff am Membrantransportmechanismus. Mit einer Blockierung des Stoffwechsels lassen sich die gefundene Kalium- und Natriumabhängigkeit schwer in Einklang bringen. SCHATZMANN konnte feststellen, daß Strophanthin keinen Einfluß auf Atmung und Glykolyse frischer Erythrozyten hat, während Stoffwechselgifte wie NaF und Monojodessigsäure, die ebenfalls die Pumpe hemmen, Atmung und Glykolyse verändern (1954). Auch WHITTAMS Ergebnisse (1958), daß Ouabain wohl die Kaliumaufnahme, aber nicht die ATP-Resynthese von inkubierten Kälteerythrozyten hemmt, spricht gegen eine Beeinflussung des Energiestoffwechsels.

Es bleibt also nur die Möglichkeit, daß die Glykoside am Membrantransportmechanismus eingreifen. Über diesen wissen wir, daß er stoffwechselabhängig ist. Beim aktiven Kationentransport wird ATP gespalten. Membranpartikel enthalten eine ATP-ase, deren Aktivierung Magnesiumionen und sowohl Natrium- als auch Kaliumionen erfordert (POST et al. 1960, DUNHAM und GLYNN 1961, GLYNN 1962, PORTIUS und REPKE 1961). WHITTAM (1962) konnte mit Hilfe der reversiblen Hämolyse Erythrozytenschatten herstellen, deren intrazelluläres Ionenmilieu er beliebig variieren konnte. Um die Membran-ATP-ase zu aktivieren, benötigt man nun intrazellulär Natrium und extrazellulär Kalium. Durch Glykoside wird die Phosphatspaltung in denselben Konzentrationen wie die Pumpe beeinträchtigt. Hierbei ergibt sich wiederum dieselbe kompetitive Hemmung mit Kalium (DUNHAM und GLYNN 1961). So nimmt bei Erhöhung der Kaliumkonzentration von 0,25 mM auf 8 mM die Hemmung der ATP-ase-Aktivität durch Strophanthin von

90 % auf 18 % ab. Diese Parallelen zur Pumpe lassen daran denken, daß diese ATP-ase mit dem Carrier identisch ist.

Der Einfluß von Kalium- und Natriumionen auf eine Membran-ATP-ase-Aktivität und deren Hemmung durch Glykoside wurde auch an anderen Geweben festgestellt, so an der Nervenmembran (SKOU 1957), der Kaninchennierenrinde (WHITTAM 1961) und dem Herzmuskel (PORTIUS und REPKE 1963). SKOUS Untersuchungen aus dem Jahre 1960 an der Nervenmembran führten zur Aufstellung folgender Reaktionsgleichungen:



$\frac{mK}{nNa} EMg_2ATP$ symbolisiert einen Enzym-Substrat-Ionen-Komplex, an den Na^+ und K^+ an 2 verschiedenen Seiten gebunden ist. m und n versinnbildlichen eine unbekannte Zahl von Ionen. Die Bindung von Natrium und Kalium an das Enzym findet gleichzeitig mit der ATP-Bindung während Schritt (1) statt. Zugabe von Na^+ und K^+ erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit von Schritt (3). Ouabain hat keine Wirkung auf die Phosphorylierung des Enzyms während Schritt (1) und (2), aber es hemmt den aktivierenden Effekt von Na^+ und K^+ auf Schritt (3) durch eine mit den Kationen konkurrierende Bindung an das Enzym während Schritt (1). Diese müßte dabei an der äußeren Zelloberfläche erfolgen, denn die Hemmung des aktiven Kationentransportes durch Glykoside wird, wie schon erwähnt, nur beobachtet, wenn diese von außen an die Zellmembran herangebracht werden (CALDWELL und KEYNES 1959). Anorganisches Phosphat wird durch dieses Enzym in der Erythrozytenmembran nicht nach außen befördert sondern intrazellulär freigesetzt (SCHATZMANN 1964).

Durch einen direkten Angriff der Glykoside an der Zellmembran läßt sich nicht nur die Beeinträchtigung des aktiven Ionentransportes sondern auch die Hemmung passiver Ionenströme erklären. GLYNN bringt diesen Befund auch mit der Carriertheorie

in Einklang (1964). Werden die passiven Ströme ohne Zugabe von Hemmsubstanz gemessen, so findet er sie größer, als sie auf Grund der Verteilung errechnet werden. Dies führt zu der Annahme, daß diese aus zwei Komponenten bestehen: einer auf einfacher Diffusion beruhenden und einer zweiten, an der der Carrier beteiligt ist, der nun die Ionen ohne Energieverbrauch in entgegengesetzter Richtung, bergab befördert. Diese zweite Komponente ist durch Glykoside ebenfalls hemmbar.

Es bleibt nun die Frage, ob die Hemmung von Ionenbewegungen Ursache der inotropen Wirkung ist. Nimmt man die Hypothese HAJDUS (1959) zu Hilfe, so könnte diese tatsächlich für die Auslösung des kontraktionsverstärkenden Glykosid-effekts verantwortlich sein. Der Autor erklärt die positiv inotrope Wirkung durch eine Abnahme des Kaliumrückstroms in die Zelle nach der Erregung. Hierdurch würde das Verhältnis der intrazellulären Konzentration der einwertigen Kationen zu der der kontraktilen Proteine verändert, von dem die Kontraktionskraft abhängig sei. Wäre dies der Fall, so müßte man eine intrazelluläre Kaliumabnahme nach therapeutischen Dosen erwarten. Hierzu findet man in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben. So gibt es Untersucher, die nach inotropen Glykosiddosen eine Abnahme der intrazellulären Kaliumkonzentration erhalten, andere, die keine Änderung feststellen, und wieder andere, die sogar geringe Zunahmen des intrazellulären Kaliumgehaltes verzeichnen. Tabelle V gibt einen kurzen Überblick über die Versuchsbedingungen und Ergebnisse einiger dieser Autoren. Es ist zu ersehen, daß die widersprechenden Befunde trotz ähnlicher Methoden erhoben werden. Man kann daher wohl annehmen, daß lediglich inotrop wirkende, 'therapeutische' Glykosiddosen keine Änderung des intrazellulären Kaliumgehaltes verursachen und die nach beiden Richtungen abweichenden Ergebnisse in den Bereich der experimentellen Streuung fallen. Es ist außerdem schlecht vorstellbar, daß ein Kaliumverlust des Gewebes mit einer inotropen Wirkung verbunden sein soll, da aus klinischen Arbeiten bekannt ist, daß am insuffizienten Herzmuskel der Kaliumgehalt vermindert ist (HARRISON 1930, MANGUN 1941,

Tabelle V: Untersuchungen einiger Autoren zum Verhalten des intrazellulären Kaliumgehaltes unter der
Einwirkung von inotropen Glykosidosen

Versuchsergebnisse mit inotrop wirkenden Glykosidosen	Versuchsanordnung		Temp.	Reiz- frequenz	Inkub. Medium	Gas	Art der Kalium- bestimmung
	Herz in situ	isoliertes Organ					
I. geringe Zunahme der (K) _i	HAGEN (1939)	Kaninchen-Langen- dorff Präparation		spontan	Locke	O ₂	chem. im Gewebe des li. Ventrikels
	TUTTLE (1961)	li. Kaninchen- vorhof	37°	4/sec	Tyrode	95% O ₂ 5% CO ₂	flammenphotometr. im Gewebe
	GRUPP (1964)	Hund		2,3/sec			indirekt durch Ra- dioaktivitätsmessun- gen in der a-v-Diff.
	WEDD (1939)	Katze		spontan			chem. im Gewebe
II. keine Änderung der (K) _i	WEDD (1939)	Schildkrötenherz- muskelseifen		nicht an- gegeben	Ringer	O ₂	chem. im Gewebe
	TUTTLE (1961)	Kaninchen		spontan			flammenphotometr. im Gewebe
	KLAUS (1962)	li. Meerschwein- chenvorhof	30°- 32°	2,3/sec- 2,7/sec	Tyrode	95% O ₂ 5% CO ₂	flammenphotometr. u. indirekt durch Ra- dioaktivitätsmessun- gen in der a-v-Diff.
	CALHOUN (1931)	Bund		spontan			chem. im Gewebe
III. geringe Abnahme der (K) _i	GREFF (1962)	Meerschweinchen- Langendorff-Präp.	37°	spontan	Tyrode	95% O ₂ 5% CO ₂	flammenphotometr. im Gewebe und der a-v-Differenz
	MÜLLER (1965)	Schaf- und Kalb- Trapeziusmuskeln	37°	1/sec	Tyrode	95% O ₂ 5% CO ₂	indirekt durch Ra- dioaktivitätsmessun- gen des Gewebes

zitiert nach SCHWIEGK und RIECKER 1960). CLARKE und MOSHER (1952) stellten bei autoptischen Untersuchungen fest, daß sich durch Digitalisierung der abgesunkene Kaliumgehalt des Gewebes wieder normalisiert. Eine weitere experimentelle Methode, die Ionenverteilung zu erfassen, ist die Messung des Membranpotentials. Dieses ist nach HODGKIN und HUXLEY (1952) als Kaliumpotential aufzufassen und wird vom Verhältnis der inneren zur äußeren Kaliumkonzentration bestimmt. Bei einer intrazellulären Kaliumverarmung müßte das Ruhepotential abnehmen. Die in der Literatur mitgeteilten Ergebnisse hierzu sind eindeutig. Sowohl DUDEL und TRAUTWEIN (1958) als auch KASSEBAUM (1963) erhielten bei inotropen Glykosiddosen keine Änderung des Ruhepotentials. Besonders bemerkenswert ist die Arbeit von MÜLLER aus dem Jahre 1965. Bei gleichzeitiger Messung der Aktivität des mit radioaktivem Kalium angereicherten Muskels und Registrierung des Membranpotentials fand er wohl eine Aktivitätsabnahme, von der er auf eine Verringerung des intrazellulären Kaliumgehaltes um 20 % schloß, aber keine Änderung des Ruhepotentials. Bei einer 20 %-igen Kaliumverminderung errechnet sich aber nach der Nernst'schen Formel eine Abnahme des Ruhepotentials um 6 mV,

wie folgt:
$$E = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{(K)_i}{(K)_a} \quad (1)$$

oder
$$E = Kf \cdot \log \frac{(K)_i}{(K)_a} \quad (2)$$

E = Membranpotential (Zelloberfläche positiv gegen Zellinneres)

R = allgemeine Gaskonstante

T = absolute Temperatur

F = Faraday'sche Konstante

Kf enthält $\frac{R \cdot T}{F}$ und einen Umrechnungsfaktor von natürlichen auf Zehnerlogarithmen

$(K)_i$ = innere Kaliumkonzentration

$(K)_a$ = äußere Kaliumkonzentration

Kf bei 37° = 61,5 (nach KORDATZKI 1934)

Setzt man für $(K)_i$ = 150 mM K und für $(K)_a$ = 4 mM K, so ergibt sich nach Gleichung (2):

$$E = 61,5 \cdot \log \frac{150}{4}$$

$$E = 61,5 \cdot 1,574 = \underline{96,8 \text{ mV}}$$

Bei einer 20 %-igen Abnahme der intrazellulären Kaliumkonzentration auf 120 mM K ergibt sich dann:

$$E' = 61,5 \cdot \log \frac{120}{4}$$

$$E' = 61,5 \cdot \log 30$$

$$E' = 61,5 \cdot 1,4771 = \underline{90,84 \text{ mV}}$$

Es müßte also eine Abnahme des Membranruhepotentials von 6 mV zu messen sein. Da dies offenbar nicht der Fall war, war die Radioaktivitätsabnahme möglicherweise anders zu erklären als durch eine Verminderung der intrazellulären Kaliumkonzentration.

Die obigen Ausführungen zeigen, daß während der rein positiv inotropen Wirkung nicht mit einem Kaliumverlust des Gewebes zu rechnen ist und deshalb eine Änderung des intrazellulären Kaliumgehaltes als Ursache für die Kontraktionsverstärkung unwahrscheinlich ist. Es sind jedoch zweifellos Parallelen zwischen der inotropen Wirkung und der Ionenpumpenhemmung von Glykosiden vorhanden. Möglicherweise ist die gleichzeitig mit der Beeinträchtigung des aktiven Transportes zu verzeichnende Hemmung passiver Ströme, wie GLYNN (1957) sie fand, an der Auslösung der inotropen Wirkung beteiligt. Solche passiven Ionenströme sind ja im Augenblick der Erregung besonders stark und umfassen auch die zweiwertigen Kationen wie Ca^{2+} . So könnte, wenn diese dann unter Glykosideinwirkung gehemmt werden, die elektromechanische Koppelung im Sinne der stärkeren Kraftentwicklung beeinflußt werden. Die genaueren Einzelheiten des Vorgangs bleiben dabei noch unklar.

Zusammenfassung

Seit CALHOUN im Jahre 1931 eine Einwirkung von Glykosiden auf den Ionengehalt des Herzmuskels feststellte und diese später auch an anderen Geweben gefunden wurde, steht zur Diskussion, ob der Einfluß auf Ionenbewegungen durch die Zellmembran mit der positiv inotropen Herzwirkung gekoppelt ist. Ständen die beiden Wirkungen in Beziehung zueinander, so müßte eine Variation des umgebenden Ionenmilieus oder eine Änderung am Molekül des Glykosids beide Effekte gleichsinnig beeinflussen. Diese Frage wurde in der vorliegenden Arbeit experimentell geprüft. Die positiv inotrope Glykosidwirkung wurde am Meerschweinchenpapillarmuskel gemessen. Zur Untersuchung des aktiven Ionentransportes wurden Meerschweinchenerythrozyten verwendet, die vorher in der Kälte gelagert wurden.

Die Untersuchung der Kaliumabhängigkeit der Glykosidwirkung am Papillarmuskel ergab eine Abschwächung der inotropen Wirkung durch Erhöhung der Kaliumkonzentration im Außenmedium. Dem entspricht die Kaliumabhängigkeit der Hemmung des aktiven Ionentransportes an der Erythrozytenmembran (GLYNN 1957).

Durch Hydrierung des Lactonringes der drei Glykoside Ouabain, Digitoxin und Digoxin wurde eine konstante Wirkungsabschwächung der Ionenpumpenhemmung an der Erythrozytenmembran erzielt, die der Abnahme der inotropen Wirkung entspricht.

Eine Verminderung der Natriumkonzentration des Inkubationsmediums ergab eine Abschwächung der glykosidbedingten Hemmung des aktiven Ionentransportes, wobei das Ausmaß des Wirkungsverlustes mit der Abnahme der inotropen Glykosidwirkung am Papillarmuskel vergleichbar ist.

Die gefundenen Parallelen zwischen der Hemmung von Ionenbewegungen durch die Zellmembran und der positiv inotropen Wirkung der Glykoside lassen eine Koppelung der beiden Vorgänge möglich erscheinen, deren Mechanismus noch ungeklärt bleibt.

Literatur

BACH, E.J. und M. REITER

Der Einfluß der Hydrierung des Lactonringes von Ouabain und Digoxin auf die letale Wirkung am Meer-schweinchen und auf die inotrope Wirkung am isolierten Papillarmuskel.

Arch.exp.Path.Pharmak. 247, 334-335 (1964)

BAKER, J.B.E.

The influence of calcium and potassium ions on the toxicity of Ouabain.

Brit.J.Pharmacol. 2, 257 (1947)

BARNES, D.W.H., J.F. LOUTIT and E.B. REEVE

A comparison of estimates of circulating red blood cell volume given by the ashby marked red cell method and the T 1824-haematocrit method in man.

Clin.Sci. 7, 136-154 (1948)

CALDWELL, P.C. and R.D. KEYNES

The effects of Ouabain on the efflux of sodium from a squid giant axon.

J.Physiol. 148, 8P-9P (1959)

CALHOUN, J.A. and T.R. HARRISON

Studies in congestive heart failure. IX. The effect of Digitalis on the potassium content of the cardiac muscle of dogs.

J.clin.Invest. 10, 139-144 (1931)

CAPRIO, A. and A. FARAH

The effect of the ionic milieu on the response of rabbit cardiac muscle to Ouabain.

J.Pharmacol. 155, 403-413 (1967)

CAVIEZEL, R. und W. WILBRANDT

Die Abhängigkeit der bleibenden Herzglykosidwirkung
von der Kalium- und Calciumkonzentration während der
Glykosideinwirkung auf das Herz.

Helv.Physiol.Acta 16, 12-21 (1958)

CLARKE, N.E. and R.E. MOSHER

The water and electrolyte content of the human heart in
congestive heart failure with and without digitalization.

Circulation 5, 907-914 (1952)

DUDEL, J. und W. TRAUTWEIN

Elektrophysiologische Messungen zur Strophanthinwirkung
am Herzmuskel.

Arch.exp.Path.Pharmak. 232, 393-407 (1958)

DUNHAM, E.T. and I.M. GLYNN

Adenosinetriphosphatase activity and the active
movements of alkali metal ions.

J.Physiol. 156, 274-293 (1961)

EDWARDS, C. and E.J. HARRIS

Factors influencing the sodium movement in frog muscle
with a discussion of the mechanism of sodium movement.

J.Physiol. 135, 567-580 (1957)

ENSELBERG, C.D., H.G. SIMMONS and A.A. MINTZ

The effects of potassium upon the heart, with special
reference to the possibility of treatment of toxic
arrhythmias due to Digitalis.

Amer.Heart J. 39, 713-728 (1950)

FÖRSTER, W. und W. SZIEGOLEIT

Über Korrelationen zwischen der Hemmung des aktiven Natrium-
transportes bei Erythrozyten und der positiv inotropen Wir-
kung von Digitaliskörpern nach Phenylbutazonschädigung.

Experientia 18, 573-575 (1962)

FRIEDMAN, M. and R. BINE, jr.

Observations concerning the influence of potassium upon the action of a Digitalis glycoside (Lanatoside C).

Amer.J.med.Sci. 214, 633-638 (1947)

GARB, S. und V. VENTURI

The differential actions of potassium on therapeutic and toxic effects of Ouabain.

J.Pharmacol. 112, 94-98 (1954)

GLYNN, I.M.

The action of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in red cells.

J.Physiol. 136, 148-173 (1957)

GLYNN, I.M.

Activation of adenosinetriphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium.

J.Physiol. 160, 18P (1962)

GLYNN, I.M.

The action of cardiac glycosides on ion movements.

Pharmacol.Rev. 16, 381-400 (1964)

GREEFF, K., K. MENG und E. MOOG

Der Einfluß nichttoxischer und toxischer Konzentrationen herzwirksamer Glykoside auf die Kaliumkonzentration isolierter Herzpräparate.

Arch.exp.Path.Pharmak. 244, 270-282 (1962)

GREEN, J.P., N.J. GIARMAN and W.T. SALTER

Combined effects of calcium and potassium on contractility and excitability of mammalian myocardium.

Fed.Proc. 10, 333 (1951)

GRUPP, G. and A. CHARLES

Effects of Ouabain and 3-Acetyl-Strophanthidin on potassium exchange in the dog heart in situ.

J.Pharmacol. 143, 356-365 (1964)

HAGEN, P.S.

The effects of Digilanid-C in varying dosage upon the potassium and water content of rabbit heart muscle.

J. Pharmacol. 67, 50-55 (1939)

HAJDU, S. and E. LEONARD

The cellular basis of cardiac glycoside action.

Pharmacol.Rev. 11, 173-209 (1959)

HARRISON, T.R., C. PILCHER and G. EWING

Studies in congestive heart failure. IV. The potassium content of skeletal and cardiac muscle.

J.clin.Invest. 8, 325 (1930)

HODGKIN, A.L. and A.F. HUXLEY

The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo.

J.Physiol. 116, 473-496 (1952 b)

HOLLAND, W.C. and J. SEKUL

Influence of K^+ and Ca^{++} on the effect of Ouabain on Ca^{15} entry and contracture in rabbit atria.

J.Pharmacol. 133, 289-294 (1961)

JOYCE, C.R.B. and M. WEATHERALL

Cardiac glycosides on the potassium exchange of human erythrocytes.

J.Physiol. 127, 33P (1955)

KAHN, J.B.jr. and G.H. ACHESON

Effects of cardiac glycosides and other lactones and of certain other compounds on cation transfer in human erythrocytes.

J.Pharmacol. 115, 305-318 (1955)

KAHN, J.B.jr.

Effects of various lactones and related compounds on cation transfer in incubated cold-stored human erythrocytes.

J.Pharmacol. 121, 234-251 (1957)

KASSEBAUM, D.G.

Electrophysiological effects of Strophanthin in the heart.

J.Pharmacol. 140, 329-338 (1963)

KLAUS, W., G. KUSCHINSKY und H. LÜLLMANN

Über den Zusammenhang zwischen positiv inotroper Wirkung von Digitoxigenin, Kaliumflux und intrazellulären Ionenkonzentrationen im Herzmuskel.

Arch.exp.Path.Pharmak. 242, 480-496 (1962)

KORDATZKI, W.

Taschenbuch der praktischen pH-Messung

Verlag von Rudolph Müller u. Steinicke, München (1934)

KUSCHINSKY, G., H. LÜLLMANN und U. WOLLERT

Über eine mangelnde Parallelität zwischen Ionenpumpenhemmung und Kontraktionskraftsteigerung.

Experientia 20, 566 (1964)

LUNDGAARD-HANSEN, P.

Vergleich der Wirkungen von Calcium und Digitalis auf die aktiven und passiven Kaliumbewegungen durch die Erythrozytenmembran.

Arch.exp.Path.Pharmak. 231, 577-585 (1957)

MAIZELS, M.

Factors in active transport of cations.

J.Physiol. 112, 59-83 (1951)

MANGUN, G.H., H.S. REICHEL und U.C. MYERS

Arch.intern.Med. 67, 320 (1941)

MATCHETT, P.A. and J.A.JOHNSON

Inhibition of sodium and potassium transport in frog sartorius in the presence of Ouabain.

Fed.Proc. 13, 384 (1954)

MILLINS, L.J. and A.S. FRUMENTO

The sodium effluxes from muscle.

Fed.Proc. 20, 142 (1961)

MÜLLER, P.

Ouabain effects on cardiac contraction, action potential, and cellular potassium.

Circulat.Res. 17, 46-56 (1965)

NAYLER, W.

The effects of potassium on the response of the isolated heart to Strophanthine G.

J.exp.Biol.med.Sci. 36, 323-332 (1958)

PONDER, E.

Accumulation of potassium by human red cells.

J.Gen.Physiol. 33, 745-757 (1950)

PORTIUS, H.J. und K. REPKE

Influence of cardiac poisons and of some of their derivatives on membrane-ATP-ase.

Biochem.Pharmacology 8, 36 (1961)

PORTIUS, H.J. und K. REPKE

Versuche zur Charakterisierung einer Transport ATP-ase
für Na^+ und K^+ in der Zellmembran des Herzmuskels.

Mbr.Dt.Akad.Wiss. 5, 88-90 (1963)

POST, R.L., C.R. MERRIT, C.R. KINSOLVING and C.D. ALBRIGHT

Membrane adenosinetriphosphatase as a participant in
the active transport of sodium and potassium in the
human erythrocytes.

J.Biol.Chem. 235, 1796-1802 (1960)

REITER, M.

Die Beziehung von Calcium und Natrium zur inotropen
Glykosidwirkung.

Arch.exp.Path.Pharmak. 245, 487-499 (1963)

SALTER, W.T. and E.A. RUNNEL

A nomogram for cardiac contractility involving calcium,
potassium, and Digitalis like drugs.

Amer.J.Physiol. 165, 520-526 (1951)

SAMPSONE, J.J., C. ALBERTON and B. KONDO

The effect on man of potassium administration in relation
to Digitalis glycosides, with special reference to blood
serum potassium, the electrocardiogram, and ectopic beats.

Amer.Heart J. 26, 164-179 (1943)

SANYAL, P.N. and P.R. SAUNDERS

Action of Ouabain upon normal and hypodynamic myocardium.

Proc.Soc.exp.Biol.a.Med. 95, 156-157 (1957)

SCHATZMANN, H.J.

Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und
Natriumtransport durch die Erythrozytenmembran.

Helv.Physiol.et Pharm.Acta 11, 346-354 (1954)

SCHATZMANN, H.J.

Intracellular phosphate release by Na^+ - K^+ activated
membrane ATP-ase.

Experientia 20, 551-552 (1964)

SCHWIEGK, H. und G. RIECKER

Pathophysiologie der Herzinsuffizienz.

Handbuch der inneren Medizin Bd. IX/1

Springer-Verlag, Berlin (1960)

SKOU, J.C.

The influence of some cations on an adenosine
triphosphatase from peripheral nerves.

Biochim.Biophys.Acta 23, 394-401 (1957)

SKOU, J.C.

Further investigations on a Mg^{++} and Na^+ activated
adenosine triphosphatase, possibly related to the active,
linked transport of Na^+ and K^+ across the nerve membrane.
Biochim.Biophys.Acta 42, 6-23 (1960)

SOLOMON, A.K., T.J. GILL and L. GOLD

The kinetics of cardiac glycoside inhibition of potassium
transport in human erythrocytes.

J.Gen.Physiol. 40, 327-350 (1956)

STICKEL, F.J. und M. REITER

Zum Mechanismus der positiv inotropen Wirkung der Kalium-
Verminderung am Meerschweinchenpapillarmuskel.

Arch.exp.Path.Pharmak. 251, 150 (1965)

TUTTLE, R.S., P.N. WITT and A. FARAH

The influence of Ouabain on intracellular sodium and
potassium concentration in rabbit myocardium.

J.Pharmacol. 133, 281-287 (1961)

VICK, R.L., J.B. KAHN jr. and G.H. ACHESON

Effects of Dihydro-Ouabain, Dihydro-Digoxin, and Dihydro-Digitoxin on the heart-lung-preparation of the dog.

J.Pharmacol. 121, 330-339 (1957)

WHITTAM, R.

Potassium movements and ATP in human red cells.

J.Physiol. 140, 479-497 (1958)

WHITTAM, R.

Active cation transport as a pace-maker of respiration.

Nature 191, 603-604 (1961)

WHITTAM, R. and J.S. WILLIS

Some effects of Ouabain and Na on respiration and K-uptake in kidney cortex slices.

J.Physiol. 163, 45P (1962)

WHITTAM, R.

The asymmetrical stimulation of a membrane adenosine triphosphatase in relation to active cation transport.

Biochem.J. 84, 110-118 (1962)

WITT, P.N.

The effect of Strophanthine and calcium on potassium loss from frog Sartorius muscle.

J.Pharmacol. 119, 195 (1957)

Lebenslauf

Am 29. September 1940 bin ich als Tochter des Buchhalters Hugo Weber und seiner Ehefrau Klara, geb. Storr, in Schwäb. Gmünd geboren. Ich bin katholisch getauft und erzogen.

Von Herbst 1947 an besuchte ich vier Jahre die Volksschule in Schwäb.Gmünd und trat im Jahre 1951 an das dortige Hans-Baldung-Gymnasium für Mädchen über, wo ich im Februar 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1960 immatrikulierte ich mich an der Universität Heidelberg zum Studium der Medizin. Dort bestand ich im April 1961 das Vorphysikum und im August 1962 das Physikum. Mein klinisches Studium begann ich im Wintersemester 1962 an der Universität München. Im Wintersemester 1963 studierte ich an der Universität Freiburg und kehrte im Sommersemester 1964 wieder nach München zurück. Dort bestand ich im Dezember 1965 das Medizinische Staatsexamen. Meine Dissertationsarbeit begann ich im April 1964 bei Herrn Professor Reiter. Der experimentelle Teil dauerte bis Mai 1966.

Von Januar 1966 bis April 1966 arbeitete ich als Medizinalassistentin am Pharmakologischen Institut der Universität München und seit Juli 1966 am Kreiskrankenhaus Naila. Dort war ich zunächst 4 Monate auf der chirurgischen und dann 10 Monate auf der inneren Abteilung beschäftigt. Zur Zeit bin ich auf der geburtshilflich/gynäkologischen Abteilung des Hauses tätig.

Offsetdruck - Fotodruck

Josef Hogl

8520 Erlangen, Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz,) Tel. 22990

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 852 Erlangen, Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990
